

Effect of Heparin Pretreatment on Stress-induced Adrenal Ascorbic Acid Changes in the Rat¹

It was recently reported that heparin, even in small doses which had no effect on blood coagulation, inhibited the action of the adrenocorticotrophic hormone (ACTH) on circulating eosinophils, blood sugar and blood pyruvic acid in man². Since heparin is an acidic and ACTH a slightly basic substance, the inhibition of the normal responses following ACTH administration was believed to have resulted from its inactivation by the formation of a complex with heparin.

The present investigation was undertaken to determine whether heparin would also interfere with the depletion of adrenal ascorbic acid by endogenous ACTH liberated in response to various stressor agents.

Male white rats weighing from 150 to 250 g were used in the study. They received an initial subcutaneous injection of either 3 mg of the sodium salt of heparin (equivalent to 300 I.U.) or a placebo injection of an equal volume of saline. Two and one-half hours later a second injection containing the stress-producing agent was injected intraperitoneally in all experimental groups except that submitted to cold stress. 90 min after the injection of the stress-producing agent the animals were killed by the intraperitoneal injection of 40 mg pentobarbital sodium.

Blood was obtained by cardiac puncture, the adrenals were excised, and the adrenal ascorbic acid determined by the method of ROE and KUETHER³. Plasma heparin levels were determined metachromatically by the method of JAQUES, RICKER and BRUCE-MITFORD⁴. The following stress-producing agents at a dose per 100 gm body weight were used: sodium salicylate, 20 mg; epinephrine, 20 µg; histamine acid phosphate, 1 mg. All volumes were adjusted to 0.2 ml. per 100 g body weight. Animals submitted to cold

¹ This work was supported in part by a grant from the National Research Council of Canada.

² L. WEISSBECKER and A. SCHROTER, Acta endocrinol. 15, 66 (1954).

³ J. H. ROE and C. H. KUETHER, J. biol. Chem. 147, 399 (1943).

⁴ L. B. JAQUES, I. G. RICKER, and M. BRUCE-MITFORD, Rev. Canad. Biol. 6, 740 (1947).

stress were placed in the cold room at -2° to -4°C for exactly 1 h. To evaluate the effect of the experimental procedure, an additional group of rats received only saline injections.

The results are summarized in the Table which shows the mean adrenal ascorbic acid concentrations and plasma heparin levels in animals from the control and experimental groups. The decrease in adrenal ascorbic acid was significant ($P < 0.01$) in all groups of animals subjected to stress, whether or not they were pretreated with heparin. The injection of heparin by itself did not produce a significant change in the adrenal ascorbic acid level. There were no significant differences in plasma heparin levels in any group pretreated with heparin, suggesting that stress did not affect the plasma heparin level.

The study demonstrated that the preliminary treatment with heparin did not block the effect of endogenous ACTH on the adrenal cortex. However, it has been reported from this laboratory⁵ that the leukocyte response to either endogenous or exogenous ACTH was blocked by the same dose of heparin as that used in this experiment. Since heparin did not prevent the action of ACTH on the adrenal cortex, it must have interfered at a later stage of the stress syndrome, such as the release of the hormones from the adrenal cortex, their transport in the blood or their action at the cellular level. It has been demonstrated that heparin may play a physiological role in fat transport⁶ and since the adrenocortical hormones have lipid-like solubility characteristics, it could be possible that heparin is concerned with their transport from the adrenal cortex to the target organ. In the absence of further information, however, it is not possible to define in greater detail the site or mode of action of heparin interference with the responses to stress.

F. R. MORRIS⁷, J. LOWENTHAL,
and L. H. HAMILTON

Department of Physiology, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada, December 21, 1955.

⁵ L. H. HAMILTON and J. LOWENTHAL, Endocrinology (in press).

⁶ S. W. LEVY and R. L. SWANK, J. Physiol. 123, 310 (1954).

⁷ Holder of a Lederle Medical Research Fellowship, at the University of Saskatchewan, College of Medicine, from June 1 to August 31, 1954.

Effect of heparin pretreatment on the depletion of the adrenal ascorbic acid by different stress-producing agents

Treatment	Number of animals	Adrenal ascorbic acid concentration mg/100 g Mean \pm S. E.	Percent decrease from control	Plasma heparin level, units/ml Mean \pm S. E.
Saline saline	9	449.7 \pm 23.1		
Heparin saline	7	462.6 \pm 24.6 > 0.5		1.53 \pm 0.25
P value for difference*				
Saline salicylate	5	313.6 \pm 22.4	30**	
Heparin salicylate	5	317.8 \pm 25.3 > 0.5	29**	1.29 \pm 0.20
P value for difference				
Saline epinephrine	6	285.8 \pm 23.8	36**	
Heparin epinephrine	5	248.1 \pm 34.0 > 0.3	45**	1.37 \pm 0.17
P value for difference				
Saline histamine	5	261.5 \pm 27.3 > 0.5	42**	
Heparin histamine	5	267.8 \pm 19.3	41**	1.35 \pm 0.23
P value for difference				
Saline cold	5	305.9 \pm 10.5	32**	
Heparin cold	5	286.9 \pm 25.2 > 0.5	37**	1.35 \pm 0.21
P value for difference				

* P value greater than 0.05 not considered significant.

** Decrease from control highly significant, P value less than 0.01.

Zusammenfassung

Vorbehandlung mit Heparin hat keinen Einfluss auf die Verminderung der Ascorbinsäure der Nebennierenrinde nach Verabfolgung von Natriumsalicylat, Epinephrin, Histamin und Kälteeinwirkung.

DISPUTAN DUM**Zur Entstehung der Magensalzsäure über einen «Precursor»**

Bisher war man der Ansicht, dass die Salzsäure erst in einer inaktiven Form in der Schleimhaut des Magens entsteht, als eine Abhandlung von BRADFORD und DAVIES¹ erschien, die auf Grund von drei brauchbaren Indikatorergebnissen das Gegenteil beweisen will. In dieser Arbeit haben beide Autoren überzeugend nachgewiesen, dass in der Parietalzelle der sezernierenden Schleimhaut des Magens vom Frosch und auch anderer Tiere die pericanalikulären Partien des Zytosplasmas ein stark saures Milieu mit einem pH < 1,4 aufweisen.

Sie folgern daraus, dass die Salzsäure nicht erst an der Oberfläche der Schleimhaut entsteht – nachdem sich in der Parietalzelle der Schleimhaut ein «Precursor», eine inaktive Form der Salzsäure, gebildet hat – sondern direkt in der Parietalzelle in der Tiefe der Schleimhaut.

Bevor wir zu dieser *Deutung* Stellung nehmen, sei kurz die besondere Technik wiedergegeben, deren sich die Verfasser bedient haben: Die frisch entnommenen Froschmägen werden zurechtgestutzt; an beiden Enden zugebunden, kommen sie in eine entsprechende wässrige Nährösung, die mit einem Gemisch von 5% Kohlensäure und 95% Sauerstoff beatmet wird. In diese Lösung wird der Indikator und Histamin gegeben. Das besondere an dieser Färbeweise liegt darin, dass die Lösung von der nutritiven Seite des noch tätigen Magens her, fast wie im Leben, zur Einwirkung kommt.

Die drei brauchbaren Indikatoren sind Neutralrot, Acridin und Aminoazotoluol (AAT).

Der erste Farbstoff, der als «quaternary ammonium salt» gut in Wasser löslich ist, ist schon bei einem pH < 6,8 rot (KOLTHOFF 1932), was über die Azidität in der Parietalzelle nicht viel aussagt.

Der zweite Stoff Acridin ist bekanntlich eine farblose Verbindung, die bei einem pH < 4,85 im ultravioletten Licht grün und bei einem pH > 4,85 blassblau fluoresziert. Da die mit Blut gefüllten Gefässe im ultravioletten Licht auch grünlich erscheinen, so sprechen sich die Autoren in dem Sinne aus, dass das mikroskopische Bild nur mit der grössten Sorgfalt interpretiert werden darf; doch kommen sie bei Innehaltung aller Vorsichtsmassnahmen zur Annahme, dass das pH < 4,85 sein muss.

Der für die Autoren schlagende Beweis wird mit AAT geliefert, welches bei einem pH < 1,4 rot und > 2,8 gelb ist. Den beiden letztgenannten «öllöslichen» Indikatoren werden die wässrigen Partien der Magenschleimhaut dadurch zugänglicher gemacht, dass sie vorher aus salzsaurer Lösung durch rasche Neutralisation in Form von Mikrokristallen gefällt werden. Die Autoren sprechen davon, dass Mikrokristalle durch ihre grössere Oberflächenaktivität löslicher als gröbere Kristalle sein dürften, was unseres Erachtens nicht zutreffen kann; wohl aber können sie sich rascher lösen. Um eine kolloidale Lösung handelt es sich hier nicht.

¹ N. M. BRADFORD und R. E. DAVIES, Biochem. J. 46, 414 (1950).

Im Gegensatz zu BRADFORD und DAVIES ist für uns die von diesen Autoren nachgewiesene Rotfärbung der Partien um die Canaliculi und Sekretgänge des Zytosplasmas mit AAT und die grüne Fluoreszenz mit Acridin *kein Beweis* dafür, dass im Gewebe freie Salzsäure vorhanden war; letztere kann nämlich, gebunden in einem Precursor, vorhanden gewesen sein, aus dem während der Färbung unter Mitwirkung des Indikators freie Salzsäure sekundär gebildet und freigesetzt wird.

Unter einem Precursor verstehen wir ein salzaures Salz, das durch eine Schutzvorrichtung daran gehindert wird, freie Salzsäure zu bilden.

So wäre zum Beispiel Betainhydrochlorid (Acidol) dann als ein Precursor der Salzsäure anzusehen, wenn es durch entsprechende Abschirmung vor Wasser geschützt ist.

Ein HCl enthaltendes Protein oder ein amphoteres bzw. betainartiges Gebilde im wässrigen Medium der Schleimhaut ist also *erst dann* ein Precursor der Magensalzsäure, wenn es in einem nicht ionogenen ölichen Medium gelöst ist, wo es den Einflüssen der wässrigen Gewebsflüssigkeit entzogen ist, wie wir kürzlich dargelegt haben².

Als Bausteine eines derartigen physiologischen Precursors, der die erwähnten Eigenschaften aufweist, kommen allein die öllöslichen Phosphatide und (nach BERSIN³) die Acetalphosphatide der sogenannten Lipoid-Lipide in Betracht, sofern sie eine betainartige Gruppe wie die Cholinphosphorsäure besitzen. In Verbindung mit HCl entsteht dann daraus der Precursor. Ein bevorzugter Vertreter dieser Gruppe ist das Lecithin, das in Verbindung mit HCl, in Öl gelöst, den gesuchten physiologischen Precursor abgibt.

Wie kommt es nun, dass gerade mit den beiden öllöslichen Indikatoren Acridin und AAT in dem pericanalikulären Teil des Zytosplasmas das Milieu freier Salzsäure nachgewiesen wurde?

Die Base AAT ist in Wasser sehr wenig (wir fanden nur 5 γ/cm³), aber in Öl sehr leicht löslich; ihr Hydrochlorid ist dagegen nicht mehr fett-, sondern wasserlöslich. Im Gegensatz dazu bleibt Lecithin infolge seiner langen Fettketten auch als Hydrochlorid öllöslich.

Kommt nun die in Wasser suspendierte Base AAT in Berührung mit den Lipoid-Lipiden der Parietalzelle in der sezernierenden Schleimhaut des Magens, in denen HCl, an Lecithin gebunden, als Precursor im Öl vorkommt, so wird die Farbstoffbase in das bessere Lösungsmittel (Fett) gehen. In den Fettsäuren gelöst, wird dann die Farbstoffbase das HCl des Lecithinhydrochlorids binden, weil sie eine stärkere Base als Lecithin ist. Es entsteht das nicht mehr öllösliche AAT-hydrochlorid, welches wasseraffin ist. Letzteres geht in die Wasserphase, wo es durch teilweise Hydrolyse in die Base AAT und Salzsäure gespalten wird. Die Base löst sich von neuem in der Fettphase, wobei sich der Prozess solange wiederholt, bis die Konzentration der Salzsäure in der Wasserphase so gross ist, dass das Farbstoffsalt beständig bleibt und nicht weiter hydrolysiert, also bei einem pH < 1,4. Damit ist es zur Rotfärbung gekommen.

Diese Schritte lassen sich in Modellversuchen nachweisen.

Auch Acridin ist in Wasser fast unlöslich und in Fettsäuren löslich, während es sich mit seinem salzauren Salz ebenso verhält wie beim AAT. Acridin ist eine schwache Base, die immerhin Lackmuspapier noch blau

² E. SOLMS und J. BRAS, Z. Biol. 107, 321 (1954).

³ Briefliche Mitteilung.